Untersuchungen zur Substratspezifität der Leuzinaminopeptidase im Serum

von

Mohamad Cheik Dib

aus Syrien/Tartus

1966

1967 № 3

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen

Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

UNTERSUCHUNGEN ZUR SUBSTRATSPEZIFITÄT DER LEUZINAMINOPEPTIDASE IM SERUM

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Mohamad Cheik Dib

aus SYRIEN/Tartus

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. K.F. Ober
Referent: Professor Dr. med. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 1966

Untersuchungen zur Substratspezifität der Leuzinaminopeptidase im Serum.

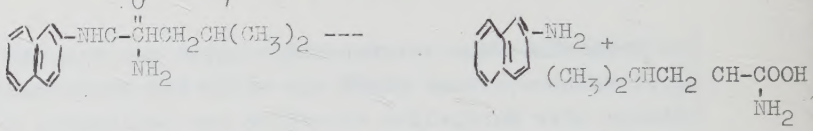
Die Ergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, daß die Leuzinaminopeptidase (LAP) vor allem bei Erkrankungen mit totalem oder partiellem Verschluß der Gallenwege im Serum mit erhöhter Aktivität anzutreffen ist. Eine strenge Spezifität besteht jedoch nicht; auch bei Leberparenchymschäden findet man eine mäßige Mitreaktion der LAP. Das ist deswegen nicht verwunderlich, weil in nahezu allen Organen LAP nachgewiesen werden konnte.

Klaus berichtete über eine Parallelität zwischen LAP und dem Zellgehalt in Körperergüssen und im Liquor (1). Schobel und Wewalka trennten mit Hilfe der Stärkeelektrophorese die LAP in neun verschiedene Isoenzyme auf, von denen I und II im normalen Serum vorkommen und im Leberhomogenat nachweisbar sind. Im Pankreashomogenat wurden die Fraktionen IV und IX gefunden (2).
Dioguardin und Mitarbeiter fanden im normalen Serum nach chromatographischer Trennung die Fraktionen VII, VIII, IX. Sie fanden bei Cholangitis, Pankreaskopf-Carcinom, akuter Hepatitis und Leberzirrhose neben der Erhöhung, der im normalen Serum vorkommenden Fraktionen, auch die Fraktionen IV, V, VI (3).

Hinsichtlich der schnellen diagnostischen Verwertbarkeit sind elektrophoretische oder chromatographische Trennverfahren zur Erhöhung der Organdifferenzierung zu aufwendig. Wir versuchten deshalb einen anderen Weg einzuschlagen, indem wir trotz der Unspezifität der sogenannten Leuzinaminopeptidase durch Verwendung zweier verschiedener Substrate, Leuzyl-β-naphthylamid und Alanyl-β-naphthylamid, die Differenzierbarkeit bei verschiedenen Krankheitsbildern überprüften.

Methodik und Material:

Die Bestimmung der LAP Aktivität im Serum beruht auf der Spaltung von Leuzyl-β-naphthylamid:



der kolimetrischen Erfassung des freigesetzten β-Naphthylamin nach Enteiweißung, Diazotierung und Kupplung mit Echtrot.
Zur Bestimmung der AAP-Aktivität dient Alanyl-β-naphthylamid, siehe oben.

Reagentien:

Trispuffer pH 7,2: 45 ml 1n HCl + 25o ml Trisstammlösung ad 1ooo ml aqua dest.
l-Leucyl-β-naphthylamid (MG = 292,1): 29,2 mg ad 1oo ml Trispuffer pH 7,2.
d,l-Alanyl-β-naphthylamid (MG =214,2): 42,8 mg ad 1oo ml Trispuffer pH 7,2.
Perchlorsäure (3,64%) : 5,2 ml 7o%ige ad 1oo ml aqua dest.
Echtrotlösung (o,1%) : 2o mg ad 2o ml aqua dest frisch vorbereitet.
Essigsäureäthylester (säurefrei)

Ansatz:

1.) 2,5 ml Substrat/Trispuffer + o,1 ml Serum vorsichtig mischen und 3o min bei 37 C inkubieren.

2.) 2,5 ml Perchlorsäure zugeben, gut mischen, filtrieren. Faltenfilter (595 1/2 Schleicher + Schüll)

3.) 1,o ml Filtrat + o,1 ml Echtrotlösung 1o min stehen lassen.

4.) 5,o ml Essigsäureester zugeben, kräftig schütteln, Phasentrennung abwarten, organische Phase mit Na_2SO_4 im Reagenzglas trocknen.

5.) Exstinktion bei 546 mμ im Eppendorf-Photometer gegen den Reagentienleerwert messen.

Zur Bestimmung der freigesetzten β-Naphthylaminmenge dient eine Eichkurve, die unter Verwendung einer 5-45γ/Ansatz ansteigenden β-Naphthylaminlösung erstellt wurde.

Ausführung:

β-Naphthylaminstammlösung: 5o mg β-Naphthylamin ad 1oo ml Methanol = 5ooγ/ml.

Verdünnung: 1o ml methanolische β-Naphthylaminstammlösung + 5o ml Perchlorsäure(5,2 ml $HClO_4$ 7o%ig ad 1oo ml aqua dest.) mit aqua dest. ad 1oo ml = 5oγ/ml.

Leerwertung: 1o ml Methanol + 5o ml Perchlorsäure ad 1oo ml Wasser.

Ansatz zur Eichkurve: o,1-o,9 ml= 5-45γ β-Naphthylamin mit Leerwertung auf 1ml ergänzen, 1 ml Echtrot zugeben, 1o min stehen lassen und mit 5 ml Essigester ausschütteln, organische Phase filtrieren, mit Na_2SO_4 das übrige Wasser entziehen und mit 546mμ bei 1 cm Schichtdicke kolometrisch messen.

Es wurden die Seren von 85 Patienten mit hepatobiliären Erkrankungen, Pankreatitis, Intoxikationen und ein Fall von Pankreaskopf-Carcinom zum Teil mehrmals im Abstand von Tagen und Wochen während des Klinikaufenthaltes untersucht. Gleichzeitig wurden die Fermente, alkalische Phosphatase, Glutaminat-pyruvat- Transaminase, Glutaminat-Oxalazetat- Transaminase, die Bilirubinwerte, Takata- und Thymolwerte bestimmt und damit verglichen. Die Diagnosen wurden nach Laparatomie, Laparaskopie, Biopsie und Sektionen bestätigt.

Die angegebenen Zahlen besagen, wieviel γ β-Naphthylamin von der in 1 ccm Serum enthaltenen Enzymaktivität freigesetzt werden, bei einem pH 7,2 und einer Inkubationszeit von 3o min und 37 C. Auf eine Umrechnung in internationale Einheiten wurde wegen der Gleichförmigkeit der Ergebnisse verzichtet. Insgesamt wurden 31o Einzelbestimmungen ausgeführt.

Normalwerte:

Normalwerte für LAP Aktivitäten bei Männern:

11-25 γ/β-Naphthylamin/1ccm Serum, bei Frauen:
9-21 γ/β-Naphthylamin/1ccm Serum.

Normalwerte für AAP Aktivitäten bei Männern:

41-63 γ/β-Naphthylamin/1ccm Serum, bei Frauen:
26-51 γ/β-Naphthylamin/1ccm Serum.

Bei den Normalseren handelt es sich um frisch entnommenes Blut von Blutspendern.

Im Pankreashomogenat(Hund) beträgt die LAP Aktivität 50 γ/β-Naphthylamin/ml Homogenat, die AAP Aktivität 92 γ/β-Naphthylamin/ml.

Im Duodenalschleimhauthomogenat(Hund) beträgt die LAP Aktivität 37 γ/β-Naphthylamin/ml Homogenat, die AAP Aktivität 35 γ/β-Naphthylamin/ml Homogenat.

Ergebnisse:

Beim Verschlußikterus auf dem Boden einer cholostatischen Hepatose oder von Konkrementen ist die LAP Aktivität um das 2,5- bis 10-fache erhöht, die AAP Aktivität ebenfalls um das 2- bis 10-fache.
Die Relation zwischen AAP/LAP beträgt 2,5:1

Bei Leberparenchymschäden steigt die LAP Aktivität gleichfalls an. Die Werte liegen allerdings wesentlich niedriger als beim Verschlußikterus. Die AAP Aktivität ist ebenso bei Hepatitis und Fettleber erhöht, aber wesentlich niedriger als beim Verschlußikterus.
Die Relation AAP/LAP liegt bei 2,6:1

Bei Leberzirrhose sind LAP und AAP Aktivitäten leicht erhöht. Sie liegen nahe dem normalen Wert und überschreiten nur selten das Doppelte der Norm.
Nur bei einer Patientin(Loibl) mit biliärer Zirrhose waren LAP und AAP Aktivitäten extrem erhöht, um das 10-fache der Norm. Die Relation AAP/LAP ist hier gering zu Gunsten der AAP verschoben, sie beträgt etwa 2,9:1

Bei Pankreatitis liegen die LAP und AAP Aktivitäten nahe der Norm.
Die Relation AAP/LAP ist 3:1
Nur bei einem Patienten(Reizler) mit Pankreaskopf-Carcinom waren beide Enzyme auf das 3-fache erhöht.

Bei Lebermetastasen fanden wir LAP und AAP Aktivitäten auf das 3- bis 5-fache erhöht. Abb. 1-5 zeigen die Ergebnisse unserer Vergleichsuntersuchungen.
Wie Abbildung 1 zeigt und wie es in den oben erwähnten AAP/LAP Verhältnissen zum Ausdruck kommt, wird das Alanyl-β-naphthylamid 2,5 bis 3 mal schneller umgesetzt als das Leuzylsubstrat. Damit werden die Meßausschläge größer ohne krankheits- oder organtypischer auszufallen.

Der Vergleich der AAP und LAP Werte mit der Aktivität der alkalischen Phosphatase (Abb. 2 u. 3) läßt eine Parallelität im Verhalten der Aminopeptidasen- und Phosphatasenaktivität bei den einzelnen Erkrankungsgruppen erkennen.

Während beim Verschlußikterus eine gewisse Abhängigkeit zwischen Bilirubinkonzentration im Serum und Aminopeptidasenaktivität besteht (Abb. 4 u.5), läßt sich eine solche bei Hepatitis- und Cirrhosekranken nicht feststellen.

Bemerkenswerterweise zeigt sich bei einem Vergleich der Transaminasenaktivität und der Aminopeptidasenaktivität für beide Substrate bei Leberparenchymschäden ein langsameres Normalisieren der Aminopeptidasenaktivität.

Tabelle: 1

	LAP	AAP	GPT	GOT
	51	121	57	214
Greif:	43	1o6	624	495
	78	188	658	165
	48	129	22o	22o
Sommer:	51	141	293	22o
	38	128	69	38
	45	98	31	21
	3o	72	33o	167
Salomon:	46	1o1	2249	5o8
Pilzvergiftung	36	8o	214	52
	35	82	131	39
	35	77	79	14

	LAP	AAP	GPT	GOT
	43	121	495	122
Schaaf:	51	129	621	200
	46	126	137	18
Pilzvergiftung:	51	122	70	13

Diskussion:

In einer vorausgehenden Arbeit hatten wir unsere Ergebnisse der Methodischen Überprüfung der Bratton-Marshall-Reaktion zur Bestimmung der Leuzinaminopeptidase-Aktivität mitgeteilt (4). Außerdem konnten wir die ersten klinischen Ergebnisse mit dieser wesentlich verbesserten Methodik vorlegen. Dabei zeigte sich, daß diesem Enzym nur eine relative Organspezifität zukommt. Wie unsere Ergebnisse (4) in Übereinstimmung mit der neueren Literatur (5) zeigen, findet man eine erhöhte Leuzinaminopeptidasenaktivität vor allem bei hepatobiliären Erkrankungen; besonders hohe Aktivitäten bei ausgeprägter Cholestase. Eine diagnostische Zuordnung zu Leberparenchym, Gallenwegs- oder Pankreaserkrankungen ist jedoch wegen des breiten Streubereiches der Aktivitätserhöhungen oft nicht möglich.

Eine Überprüfung des Organverteilungsmusters bei der Ratte zeigte ebenso wie die Untersuchungen von Green und Mit. (7) für menschliches Gewebe die höchsten Aktivitäten in Niere, Leber, Lunge und Darmschleimhaut. Man wird deshalb nicht erwarten können, daß die im Serum anzutreffende Leuzinaminopeptidase nur einem Organ entstammt. Vielmehr wurde von mehreren Autoren auf die Heterogenität der Serum-Leuzinaminopeptidase hingewiesen. Ausführliche Untersuchungen darüber veröffentlichten Schobel und Wewalka. Danach kommen im normalen Serum ein bis zwei Enzymfraktionen vor, bei Leber-Gallen- und Pankreaserkrankungen bis zu neun. Wenn die Untersucher auch den Organursprungsort der einzelnen Fraktionen nicht sicher ermitteln konnten, so ergaben sich doch gewisse erkrankungsspezifische Alterationen einer oder mehrerer Fraktionen. Auch von anderen Untersuchern wurden ähnliche Befunde erhoben (8, 9). Wegen der methodischen Aufwendigkeit der elektrophoreti-

schen Eiweißtrennung zur Differenzierung von Isoenzymen wurde von uns in den vorgelegten Untersuchungen ein anderer Weg eingeschlagen. Es sollte versucht werden, durch Verwendung unterschiedlicher Substrate die Differenzierbarkeit der Leuzinaminopeptidase bei verschiedenen Leber-, Galle- und Pankreaserkrankungen zu verbessern. Wegen der Schwierigkeit in der Beschaffung einer größeren Anzahl chromogener Substrate beschränkten wir uns auf das Leuzyl-ß-naphthylamid und das Alanin-Derivat. Die für Gallenwegs-, Leber- und Pankreaserkrankungen geprüfte Relation der ß-Naphthylaminfreisetzung zeigt zwar einen schnelleren Abbau des Alanyl-ß-naphthylamids. Das Verhältnis zum Leuzyl-ß-naphthylamid liegt bei allen Erkrankungen zwischen 2,5 und 3.

Wenn auch bei Patienten mit Leberzirrhose und Pankreatitis dieser Quotient bei 3 liegt, so ergeben sich daraus noch keine differentialdiagnostischen Möglichkeiten. Bei graphischer Darstellung dieses Verhältnisses (Abb. 6) streuen alle Meßwerte der einzelnen Erkrankungsgruppen mit nur wenigen Ausnahmen um eine Gerade mit definierbarer Steigung. Damit erweist sich eine Differenzierung der bei den verschiedenen Erkrankungen im Serum in unterschiedlicher Relation auftretenden Aminopeptidase-Isoenzyme durch zwei verschiedene Substrate als unmöglich.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit einer größeren Anzahl von chromogenen Substraten an Organhomogenaten inzwischen von Nachlas et al. (10) mitgeteilt. Bei ihren Untersuchungen mit Leuzyl-, Glyzyl-, Alanyl-, Phenylalanyl-, Methionyl-, Glutamyl- und Arginyl-ß-naphthylamid konnte in Organhomogenaten, wie von uns im Serum bei verschiedenen Erkrankungen, eine bevorzugte Spaltung bestimmter Substrate nachgewiesen werden. Doch sind diese Unterschiede zu gering um einen sicheren diagnostischen oder differentialdiagnostischen Wert erkennen zu lassen.

Die von uns prinzipiell beobachtete bevorzugte Spaltung des d,l-Alanyl-ß-naphthylamids macht die Diskussion einer wesentlichen Frage notwendig. Kann diese Aminopeptidasenaktivität weiterhin als Leuzinaminopeptidase bezeichnet werden? Verschiedene Untersucher hatten früher berichtet, daß durch diese Aminopeptidase

Leuzylpeptide bevorzugt gespalten werden und dieses Enzym deshalb als Leuzinaminopeptidase angesprochen. Auch wurden Mn^{++} und Mg^{++} als aktivierende Faktoren angesehen. Nach den Untersuchungen von Nachlas et al. treffen diese beiden Kriterien nur für eine gereinigte Nierenaminopeptidase nicht aber, wie unsere Untersuchungen zeigen, für die Aminopeptidase-Aktivität im Serum zu. Bis zur endgültigen Klärung der Substratspezifität sollte die Bezeichnung Aminopeptidasenaktivität verwendet werden.

Im Prinzip bestätigen unsere Ergebnisse erneut, daß eine Aminopeptidasenaktivität bei allen Erkrankungen des Galle ableitenden Kanalsystems vermehrt im Serum auftritt, und daß auch Leberparenchymschäden mit geringen Aktivitätserhöhungen einhergehen. Hinsichtlich der diagnostischen Wertigkeit läßt sich die Bestimmung der Aminopeptidasenaktivität im Serum der alkalischen Phosphatase an die Seite stellen.

Allerdings reagiert die Aminopeptidasenaktivität bei Knochenerkrankungen nicht mit. Auffällig ist die im Vergleich zu den Transaminasen langsamere Normalisierungstendenz der Aminopeptidasenaktivität bei abklingender Hepatitis und ihr häufiger, gering pathologischer Ausfall bei der Fettleber. Diese Ausschläge sind jedoch zu klein, um in der Routinediagnostik verwendet werden zu können.

Zusammenfassung:

Es wurde versucht durch Einsatz zweier verschiedener Substrate, l-Leuzyl-ß-naphthylamid und d,l-Alanyl-ß-naphthylamid, die Organspezifität der Aminopeptidasen-Aktivitäts-Bestimmung im Serum zu verbessern. Obwohl die Spaltungsgeschwindigkeit des Alanylsubstrates um den Faktor 2,5 - 3 über der des Leuzylsubstrates liegt, lassen sich bei Gallenwegs-, Leber- und Pankreaserkrankungen keine wesentlichen Änderungen dieser Relation feststellen. Eine einfache Differenzierung der Aminopeptidase-Isoenzyme war durch Verwendung zweier unterschiedlicher Substrate nicht möglich.

1) [illegible], G., Ärztl. Forschg. 16 (1962) 9 u. 23

2) Schobel, B. u. F. Wewalka, Klin. Wschr. 40 (1962) 1049

3) Dioguardi, N. u. Agostini, A. Fiorelli, G. Titobello, A. Circla, E. Schweizer, Enzymol. biol clin. 1 (1961/62) 206

4) Schön, H., B. Rässler u. H.-J. Weyergraf, Ztschr. Klin. Chem. 1 (1963) 73

5) Müllner, T., A. Neumayr u. H. Pietschmann, Wien. Klin. Wschr. 74 (1962) 321

6) Schön, H. J. Rico-Irles u. N. Henning, in Vorbereitung

7) Green, M.N. K.Ch. Tsou, R. Bressler u. A.M. Seligman, Arch. Biochem. Biophys. 57 (1955) 458

8) Dubbs. Cl.A., Ch. Vivonia u. J.M. Hilburn, Nature 191 (1961) 1203

9) Smith, E.E., E.P. Pineda u. A.M. Rutenburg, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 110 (1962) 683

10) Nachlas, M.M., Th. P. Goldstein u. A.M. Seligman, Arch. Biochem. a. Biophys. 97 (1962) 223

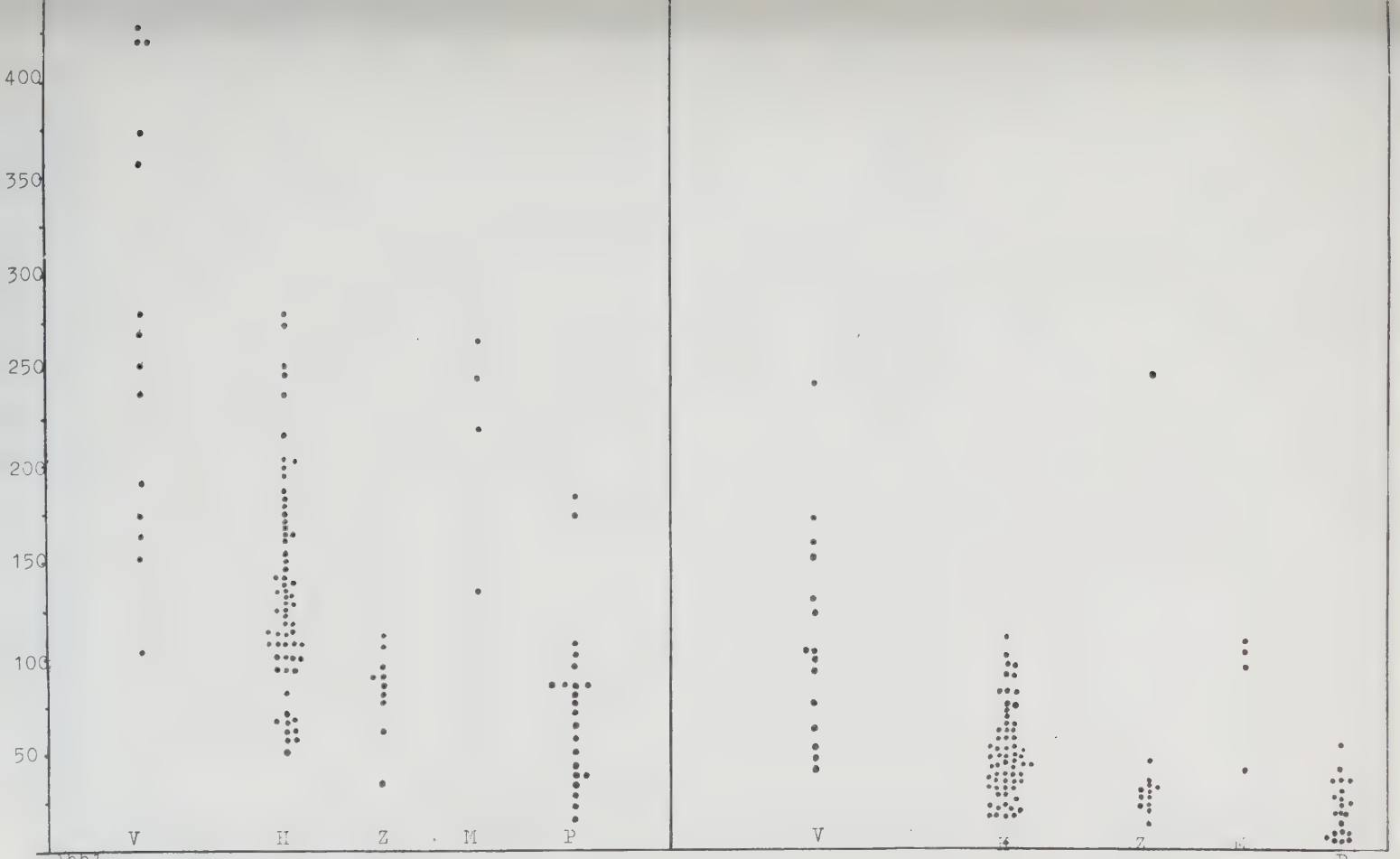


Abb1

V=Verschluß-Ikterus. H=Hepatitis. Z=Zirrhose
M=Lebermetastasen. P=Pankreaserkrankung

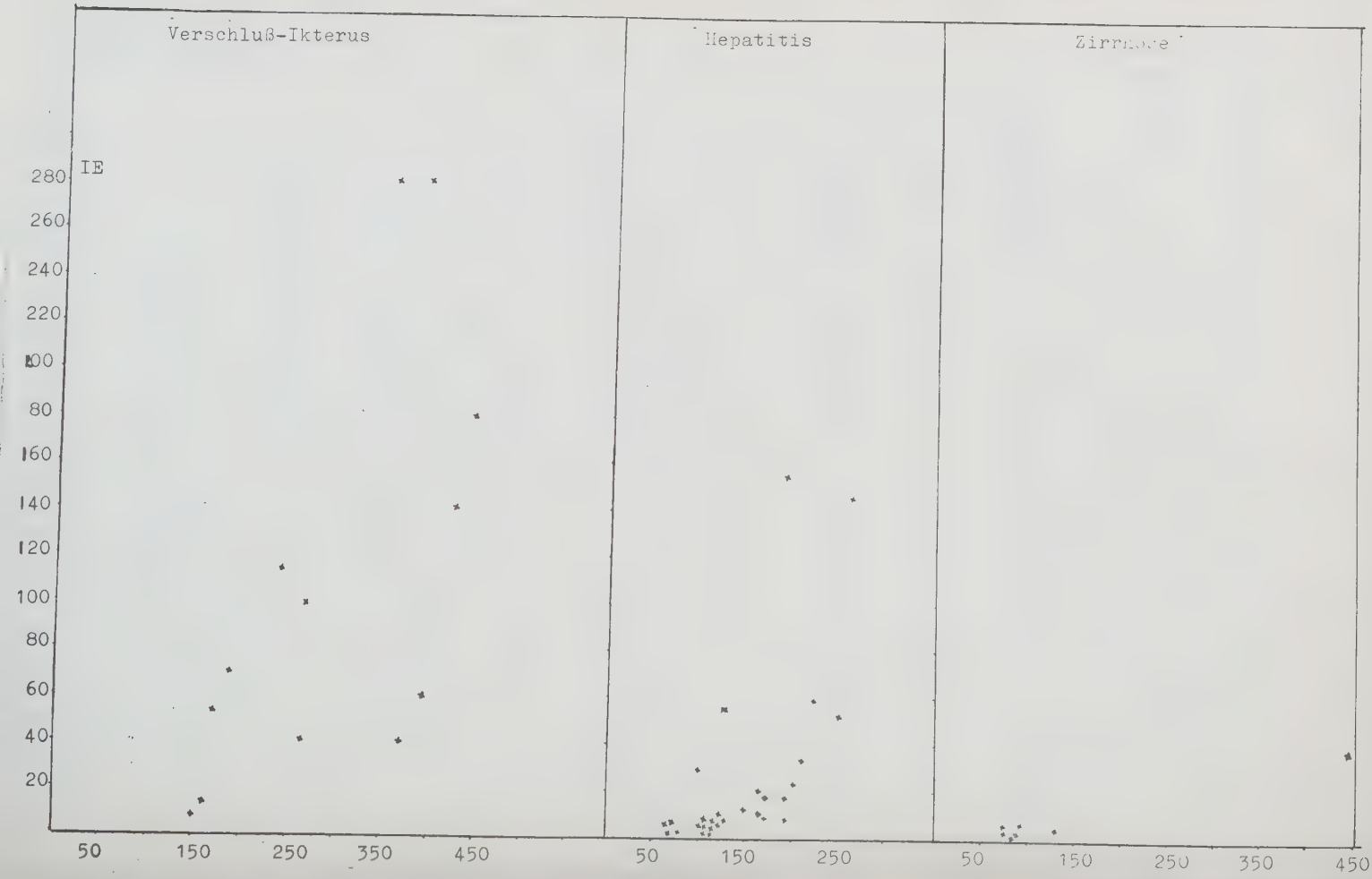


Abb.2 Vergleich zwischen alkal.Phosphatase- und Alaninwerten

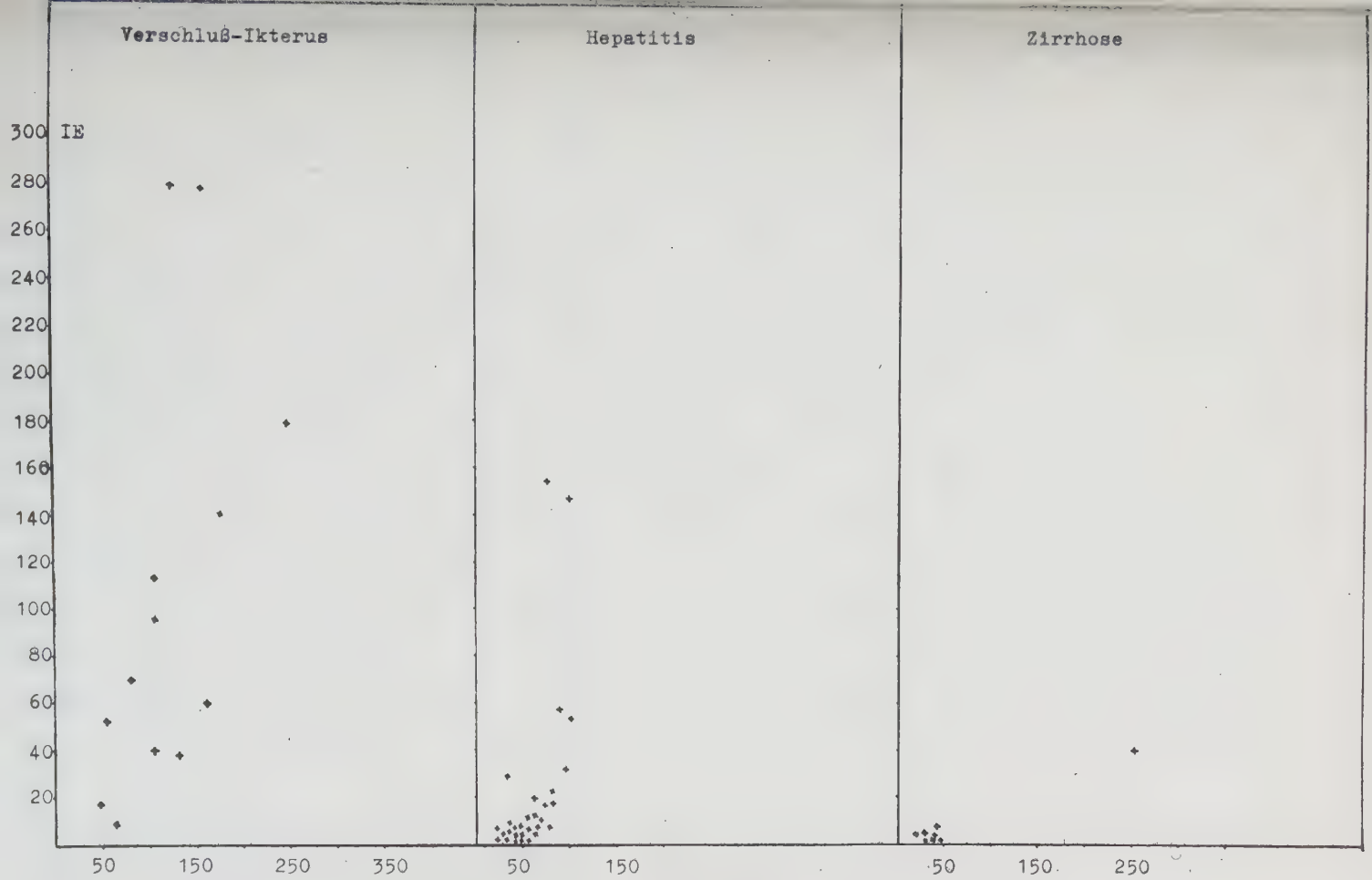


Abb.3 Vergleich zwichen alkal.Phosphatase- und Leucinwerten

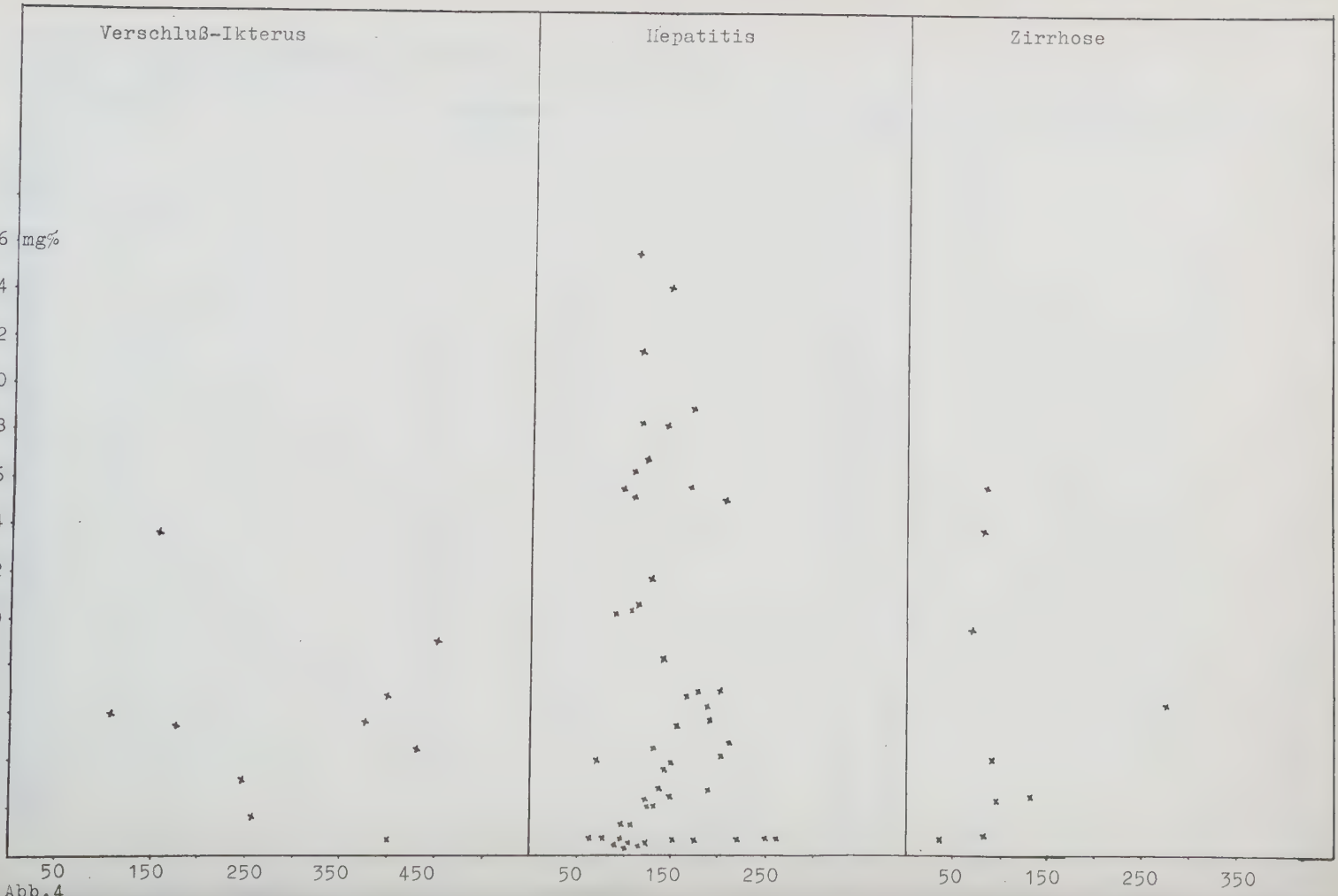


Abb.4
Vergleich zwischen Bilirubin- und Alaninwerten

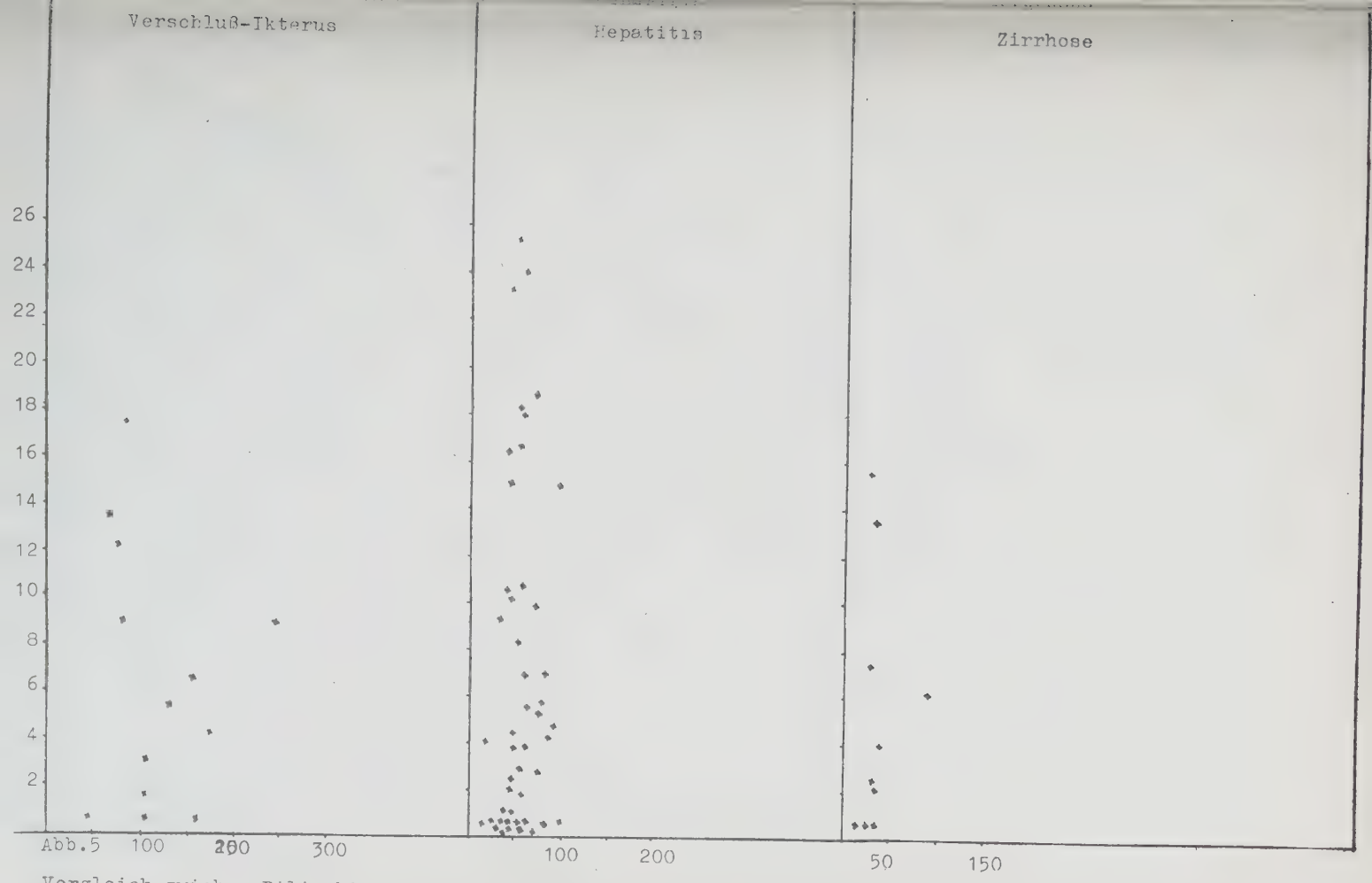
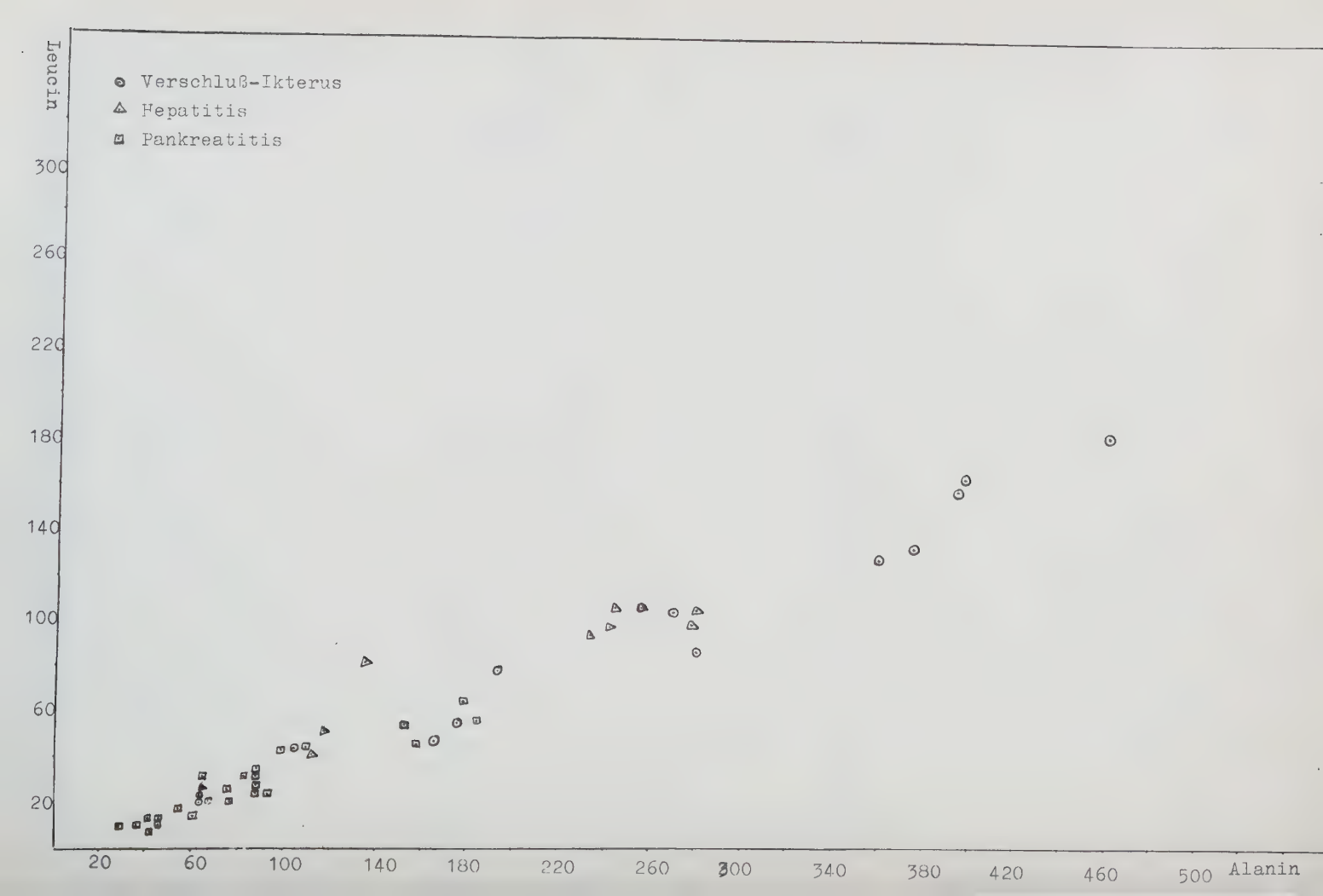


Abb.5

Vergleich zwichen Bilirubin- und Leucinwerten


Leucin
Verschluß-Ikterus
Hepatitis
Pankreatitis
300
260
220
180
140
100
60
20
20
60
100
140
180
220
260
300
340
380
420
460
500
Alanin

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. Schön†
für die Überlassung des Themas
und Herrn Professor Dr. N. Henning
für die Übernahme des Referates.

L E B E N S L A U F

Als Sohn des Kaufmanns Ahmad Cheik Dib und seiner Ehefrau Badria Fahil wurde ich am 15. 7. 1936 in Tartus/ Syrien geboren.

Von 1943 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Tartus. Von 1950 bis 1957 ging ich in die Tartus-Oberrealschule, wo ich am 8. 7. 1957 mein Abitur ablegte.

Im Januar 1958 kam ich zum Medizinstudium nach Deutschland. Zunächst besuchte ich das Goethe-Institut in Bad Aibling zum Studium der deutschen Sprache. Im Mai 1958 wurde ich in Marburg als Medizinstudent immatrikuliert. Dort beschloß ich im Sommer 1959 mein Studium mit dem Vorphysikum und wurde im Wintersemester 1959/60 in Erlangen immatrikuliert. Am 28. 7. 1961 bestand ich das Physikum.

Im Frühjahr begann ich meine Doktorarbeit in der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen, die ich im Februar 1964 beendete. Nach sechs klinischen Semestern in Erlangen meldete ich mich im Herbst 1964 zum Staatsexamen, das ich am 28. 6. 1965 bestand. Am 15. 7. 1965 begann ich im Städtischen Krankenhaus Forchheim meine Medizinalassistentenzeit auf der internen Männerabteilung und wechselte nach neun Monaten auf die chirurgische Abteilung, wo ich zur Zeit noch tätig bin.

Forchheim, den 26.9.1966 Mohamad Cheik Dib

BUCH- UND FOTODRUCK
LUDWIG MÜLLER
ERLANGEN · FAHRSTR. 5